

酶法合成头孢环己二烯

崔福绵 石家骥 白小东*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 以环己二烯甘氨酸甲酯盐酸盐为酰基供体, 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸为酰基受体, γ -氧化铝为载体的固定化巨大芽孢杆菌胞外青霉素 G 酰化酶为酰化剂, 合成了头孢环己二烯。5% 酰基供体, 2% 酰基受体, 每毫升反应物加 44IU 固定化酶, pH7.5, 25℃ 振荡反应 5h, 头孢环己二烯产率为 81%。苯乙酸、苯氧乙酸和头孢霉素 G 对酶法合成有不同程度的抑制作用。

关键词 巨大芽孢杆菌, 青霉素 G 酰化酶, 头孢环己二烯酶法合成

分类号 R392-33

头孢环己二烯(Cephadrine)为临床上广泛应用的半合成头孢霉素中的一个重要品种。市售头孢环己二烯是采用有机化学法合成的。该法步骤多, 过程长, 有机溶剂用量大, 并且产生不需要的副产物^[1~3], 因此引起人们对酶法酰化合成的注意。研究用酶有青霉素酰化酶、氨酰转移酶和 α -氨基酸酯酶^[4]。武田英夫等人^[5]用具有氨酰转移酶活性的固氮菌(*Azotobacter*)细胞作为酰化剂, 合成了头孢环己二烯。固定化酶抗反应副产物污损能力较固定化细胞强。作者以 γ -氧化铝为载体的固定化巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)胞外青霉素 G 酰化酶为酰化剂, 研究了由 7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸和环己二烯甘氨酸甲酯盐酸盐制备头孢环己二烯的酶法酰化合成。本文报道这一研究结果。

1 材料和方法

1.1 固定化青霉素 G 酰化酶

按文献[6]制备巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)胞外青霉素 G 酰化酶粗酶液。粗酶液经部分提纯后, 将酶固定于 γ -氧化铝上。以青霉素 G 为底物, 酶活力为 220IU/g。

1.2 主要化学试剂

7-氨基脱乙酰氧基头孢烷酸(简称 7-ADCA)东北制药总厂提供。环己二烯甘氨酸甲酯盐酸盐(简称 CHDGME·HCl), 山东新华制药厂提供。

1.3 头孢环己二烯的合成

将 0.1g 7-ADCA 置于 25 ml 三角瓶中, 加水 2.5 ml, 滴加 2 mol/L NaOH 溶液(约 0.25ml)至 7-ADCA 溶解, 加入 CHDGME·HCl 0.25g, 溶解后用 pH7.5、0.1mol/L 磷酸氢二钠-0.05mol/L 柠檬酸缓冲液定容至 5ml, 加固定化酶 1g, 于 25℃ 旋转振荡器(250r/min)上反应 5h。

* 浙江大学生物系生物化学专业92级毕业生, 现为中国科学院动物研究所硕士研究生。

收稿日期: 1997-03-18

1.4 头孢环己二烯产率的测定

采用对二甲氨基苯甲醛试剂法[7]测定反应前后 7-ADCA 的变化。7-ADCA 的减少即为酰化。以 7-ADCA 酰化率表示头孢环己二烯产率(%)。

1.5 头孢环己二烯的提取

采用吸附柱层析法提取。按 100 ml CAD40 大孔树脂吸附 2.5g 头孢环己二烯的比例上样。先后以水和 75% 乙醇溶液为洗脱剂,洗脱收集合成液中残留的 7-ADCA 和 CHDGME · HCl 与产品头孢环己二烯。

2 结果

2.1 7-ADCA 浓度对酶法合成的影响

在不同浓度 7-ADCA 条件下进行合成反应。表 1 表明,在仅改变 7-ADCA 浓度的情况下,7-ADCA 最适浓度为 2%,酰化率为 81%;在改变 7-ADCA 浓度的同时相应改变 CHDGME · HCl 浓度和酶量(保持三者之间用量的比例不变)的情况下,取得相同的酰化结果(酰化率 66%),所用的 7-ADCA 浓度可由前一种情况下的 3% 提高到后一种情况下的 5%。

表 1 7-ADCA 浓度对酶法合成的影响

Table 1 Effect of concentration of 7-ADCA on enzymatic synthesis of cephradine

7-ADCA 浓度 (%) Concentration of 7-ADCA	1	2	3	4	5	6
7-ADCA 酰化率* (%) Acylation of 7-ADCA	82	81	66	56	48	45
	81	81	76	69	66	62

上行数据为仅改变 7-ADCA 浓度的结果;下行数据为按比例同时改变 7-ADCA 和 CHDGME · HCl 浓度及酶量的结果。Above data from change of amount of 7-ADCA; below data from simultaneous and corresponding changes of amounts of CHDGME · HCl and enzyme with 7-ADCA.

2.2 CHDGME · HCl 浓度对酶法合成的影响

在不同浓度 CHDGME · HCl 条件下进行合成反应。由表 2 可以看出,7-ADCA 酰化率随 CHDGME · HCl 浓度增高而增高,最终达到平衡。当 7-ADCA 浓度为 2% 时,CHDGME · HCl 最适浓度为 5%,即 7-ADCA 与 CHDGME · HCl 用量之比为 1.0:2.5。

表 2 CHDGME · HCl 浓度对酶法合成的影响

Table 2 Effect of concentration of CHDGME · HCl on enzymatic synthesis of cephradine

Concentration of CHDGME · HCl (%)	1	2	3	4	5	6
Acylation of 7-ADCA (%)	34	45	58	77	81	81

2.3 酶量对酶法合成的影响

在不同酶量的条件下进行合成反应。表 3 表明,最适用酶量为每毫升反应液加 0.2g 固定化酶(44 IU),7-ADCA 酰化率为 81%。

表 3 酶量对酶法合成的影响

Table 3 Effect of amount of immobilized enzyme on enzymatic synthesis of cephradine

Enzyme amount (g/ml)	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
Acylation of 7-ADCA (%)	58	70	77	81	81	81

2.4 pH对酶法合成的影响

在不同 pH 条件下进行合成反应。图 1 表明, 头孢环己二烯酶法合成适宜 pH 范围为 7.0~7.5, 最适 pH 为 7.5。

2.5 温度对酶法合成的影响

在不同温度条件下进行合成反应。由图 2 可以看出, 在 5 h 反应时间条件下, 固定化巨大芽孢杆菌青霉素 G 酰化酶酶促合成头孢环己二烯的最适温度为 25℃。

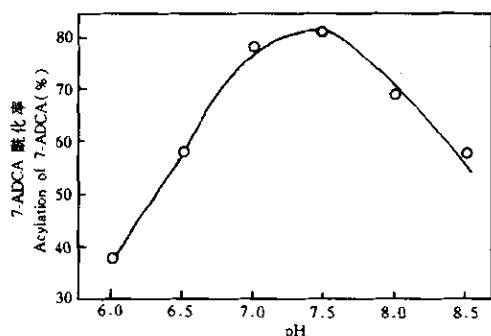


图1 pH对酶法合成的影响

Fig.1 Effect of pH value on enzymatic synthesis of cephradine

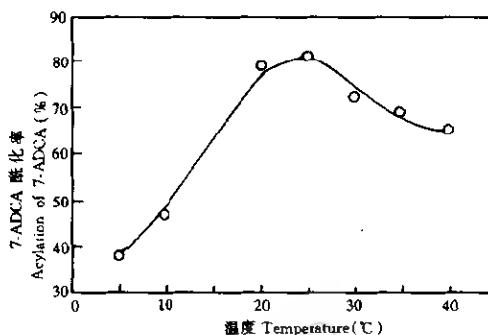


图2 温度对酶法合成的影响

Fig.2 Effect of temperature on enzymatic synthesis of cephradine

2.6 相关化合物对酶法合成的影响

将与合成反应物、产物和副产物相关的苯乙酸、苯氧乙酸、环己二烯甘氨酸、头孢霉素 G、甲醇、头孢氨苄和头孢环己二烯以 0.01% 浓度加入到合成反应系统中, 分别进行合成反应, 考察对合成的影响。结果表明, 所试 7 种化合物中, 苯乙酸、苯氧乙酸和头孢霉素 G 对合成均有抑制作用, 抑制率分别为 35%、86% 和 24%。

2.7 头孢环己二烯的提取

采用上述研究最优条件进行扩大合成实验。反应体积 500 ml (含 CHDGM₂·HCl 25g, 7-ADCA 10g), 加固定化酶 50g, pH 7.5, 25℃ 搅拌 (110r/min) 反应 4.5h。头孢环己二烯产率为 80%。合成反应液经提取处理, 得到头孢环己二烯 11.8 g, 产品收率 87%。

3 讨论

本研究结果表明, 头孢环己二烯酶法合成工艺简单, 一步酰化完成。反应完成时间取决于用酶量和反应温度。酶法和有机化学法两种酰化方法相比较, 单就 7-ADCA 酰化率而论, 二者水平相同, 均为 80% 左右。

本研究所用 γ -氧化铝为载体的固定化巨大芽孢杆菌胞外青霉素 G 酰化酶, 即可用于头孢环己二烯酰化合成, 又可用于头孢氨苄酰化合成^[8]。在两种半合成头孢霉素的酰化合成中, 该固定化酶所反映出来的动力学性质有明显差异。7-ADCA 与酰基供体最适用量之比分别为 1.0:2.5 和 1.0:2.0; 酶用量, 每克 7-ADCA 分别为 2200IU 和 1100IU; 最适 pH 分别为 7.5 和 6.5。当合成温度高于 25℃ 时, 头孢环己二烯的相对合成率低于头孢氨苄。表明酰基供体的性质决定酶在合成反应中的动力学性质。

在半合成头孢霉素酶法合成中,同一酶催化三种反应,即母核(酰基受体)酰化形成目的产物、侧链酸酯(酰基供体)水解和目的产物酰氨键水解^[9]。降低用酶(细胞)量和缩短反应时间,只能减轻目的产物的水解。我们实验了武田英夫等人^[5]分批加入酰基供体进行合成的方法。结果(未列出)表明,供体用量没有减少,受体酰化率也未提高。

参 考 文 献

- [1] Takahashi T, Yamazaki Y, Kato K *et al.* *Journal of the American Chemical Society*, 1972, **94**(11):4036~4037.
- [2] Abbott B J. *Advances in Applied Microbiology*, 1976, **20**:218.
- [3] Gardner J P. European Patent, 1993, EP 0567 323 A2.
- [4] Vandamme E J. Penicillin Acylases and Beta-Lactamases. In: Roes A H ed. *Economic Microbiology Volume 5: Microbial Enzymes and Bioconversions*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, 501.
- [5] 武田英夫, 松本郁男, 久保田勲. 公开特许公报(A), 1979, 昭 54-41388, 437~439.
- [6] 崔福绵, 韩文珍, 韩 辉等. *微生物学报*, 1996, **36**(3): 193~198.
- [7] Mishima K M, Shizuoka R I, Shizuka H S *et al.* United States Patent. 1984, 4 486 549.
- [8] 崔福绵, 朱丽钊, 韩文珍等. *微生物学报*, 1996, **36**(2):151~154.
- [9] Rhee D K, Lee S B, Rhee J S *et al.* *Biotechnology and Bioengineering*, 1980, **18**(6):1237~1247.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF CEPHRADINE

Cui Fumian Shi Jiayi Bai Xiaodong

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract Cephadrine was synthesized by γ -alumina-immobilized form of the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* with D-phenylglycine methylester hydrochloride (CH₂DGME·HCl) as acyl donor and 7-aminodeacetoxycephalosporanic acid (7-ADCA) as acyl acceptor. 0.1g of 7-ADCA was dissolved by adding 2.5 ml of distilled water and about 0.25 ml of 2 mol / L NaOH in a 25 ml flask. To the solution, after 0.25g of CH₂DGME·HCl was added, 0.1 mol / L phosphate-0.05 mol / L citric acid buffer, pH 7.5 was added to result in a volume of 5 ml with pH 7.5 Then 1g(220IU) of immobilized enzyme was added. The flask was shaken on a rotary shaker at 110r / min and 25℃ for 5 h. The conversion rate of 7-ADCA was 81%. In an expanded experiment in 500ml of reactive volume, 11.8g of cephradrine was obtained from 10g of 7-ADCA. The conversion rate of 7-ADCA was 80% with about 87% yield of cephradrine. Enzymatic synthesis was inhibited in varying degrees by phenylacetic acid, phenoxyacetic acid and cephalosporin G.

Key words *Bacillus megaterium*, Penicillin G acylase, Cephadrine enzymatic synthesis